

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659202

研究課題名(和文)細胞増殖に関わる細菌型mitoNEETシステムの網羅的解析

研究課題名(英文)Structure-function of bacterial mitoNEET homologs

研究代表者

岩崎 俊雄 (IWASAKI, TOSHIO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：40277497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：MitoNEETは、II型糖尿病改善薬のミトコンドリア標的膜酵素として同定され、創薬ターゲットとしても期待されているが、生理機能は不明である。本研究では、遺伝子操作系およびオミックス解析系が整っている高度好熱菌とシアノバクテリアを主材料として、(1)細菌型および真核細胞ミトコンドリアのmitoNEETホモログの構造生物学解析、(2)好熱菌とシアノバクテリアのmitoNEETホモログ欠損株等の機能生理解析を行った。微生物ホモログとして初めて構造機能生理相関に関する新知見を得たほか、真核生物mitoNEETにつき薬剤結合型構造の強度データ収集にも成功し、当該分野における新たな展望が開けた。

研究成果の概要(英文)：MitoNEET is a mammalian mitochondrial outer membrane iron-sulfur protein with a potential pharmacological and clinical target of pioglitazone, an insulin-sensitizer for the treatment of type II diabetes. In this study, we conducted the phenotypal analyses of a deletion strain and several mutant strains of a bacterial mitoNEET homolog (TthNEET) of *Thermus thermophilus* HB8 in comparison with the wild-type strain, and re-analyzed the available metabolome and microarray datasets of this thermophile. We also obtained the high-resolution X-ray diffraction datasets of mammalian mitoNEET in complex with several drug compounds.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：mitoNEET 鉄硫黄クラスター 金属蛋白質 構造機能生理

## 1. 研究開始当初の背景

MitoNEET は、II 型糖尿病改善薬ピオグリタゾン (アクトス) の新標的酵素として発見され、ミトコンドリア外膜に局在する。哺乳類 mitoNEET やそのホモログ Miner1/ERIS2 のノックアウトマウスでは、心筋酸素呼吸活性低下やミトコンドリア形態形成異常がみられ、短寿命になると報告されている。本課題関連では、創薬の新開発への期待から、米国・中国などの複数グループが中心となり、哺乳類材料を主とする機能解析が競争的になっていた。

MitoNEET ファミリーはヒトなどの哺乳動物だけでなく、病原性細菌に至るまで高度に保存されており、先の研究で私達は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の全ゲノム配列情報に着眼し、細菌型 mitoNEET ホモログ (TthNEET) を同定、その結晶構造解析 (1.8Å 分解能) につき、世界に先駆け成功した。また、高度好熱菌の TthNEET 遺伝子完全破壊株でも、エネルギー代謝・細胞増殖の異常を示した。

当該分野における国際的に焦眉な緊急課題は、mitoNEET ファミリーの生理機能詳細が全く不明なことにある。真核生物ミトコンドリア形態異常といった興味深いが大変複雑な要素をもつ現象では、個々の実験結果の相互解釈が困難であることから、よりシンプルなモデル生物における基本的なプロセスを理解する戦略が有効ではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、当該分野全体のブレークスルーをはかるため、「構造生物学的知見」と「ゲノム情報と逆遺伝子学的解析に基づく網羅的分子遺伝学・生理学的知見」を両輪とし、「細胞増殖に影響する細菌型 MitoNEET の網羅的構造機能生理解析」を主目的とした。具体的には、全ゲノム情報に基づき遺伝子改変系・トランスクリプトーム解析系・蛋白質発現解析系が完備された高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 とシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を主に用い、細菌型 mitoNEET 遺伝子の欠損株、変異導入株を用い、(1) 分子レベル情報に基づく複雑で動的なレドックス代謝・制御系等の変動分析、(2) 細菌型 mitoNEET 系の構造解析することを究極目標とした。さらに (3) 私達が確立した真核細胞 (ラット、シゾン、線虫) mitoNEET 発現系を用い、上記目標と並行し、mitoNEET 結合薬剤の検索とその共結晶化条件の改善、さらに薬剤結合部位の構造生物学的解析も目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 構造生物学的解析：本研究におけるリコンビナント鉄硫黄蛋白質は既報 [Iwasaki ら (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 9129; Iwasaki ら (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126, 4788 等] に基づき大量精製した。必要により発現ベクターの改変、目的遺伝子の発現領域の改変や部位特異的変異導入を行った。X 線結晶構造解析は主に SPring-8 ビームライン BL41XU を用いて強度データ収集し、精密化は連携研究者 (JASRI/SPring-8 グループ) が中心となり行った。

(2) TthNEET の機能生理解析：高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を宿主とし、耐熱性カナマイシンマーカ―遺伝子を利用して相同組換した欠損株、His タグ付加した TthNEET 相同組換株等を用いた。各種有機物培地、金属イオン、NADPH 原材料 (ニコチンアミド等)、糖類、通気条件などの添加効果と生育変化等の相関を解析し、さらに CE-TOFMS 法によるメタボローム解析データの再検討、登録されている本菌のトランスクリプトームデータ解析を行った。

(3) シアノバクテリア *SynechoNEET/PirB* の解析：シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 を材料に目的遺伝子 *pirB* (*synechoNEET*) の大量発現系の改変・改善・精製法の改良・EPR 等による分光解析を行った。また、連携研究者 (早稲田大学グループ) の指導のもとシアノバクテリア *pirB* 欠損株、*pirAB* 欠損株を作成し、生育条件の変動等の予備的表現型解析等を試みた。

## 4. 研究成果

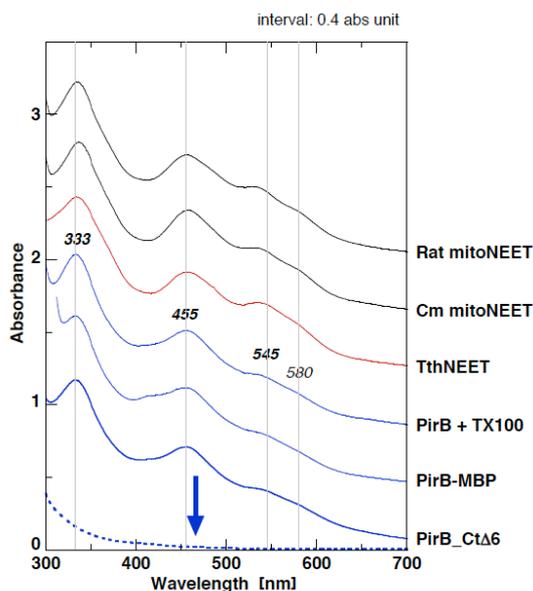
細菌型 mitoNEET は  $[2\text{Fe}-2\text{S}] (\text{His})_1 (\text{Cys})_3$  クラスタをもつ可溶性鉄硫黄蛋白質であり、電子伝達、あるいは生体内レドックス・バランスと対応した新しい生体内システムと推察される。高度好熱菌およびシアノバクテリアの全ゲノム配列情報より見出した細菌型 mitoNEET ホモログ (TthNEET および PirB) につき、構造機能生理解析を連携して実施し、下記主要成果を得、学会等でも一部発表した。

(1) *Thermus thermophilus* HB8 の TthNEET 欠損株と野生株の表現型解析を行い、(現時点では) 欠損株においてグルコース存在下、生育阻害がかかることを発見した。他の糖類、 $\text{Fe}^{3+}$ 、NADPH 原材料 (ニコチンアミド等) の効果も検討し、グルコース特異的に生育阻害が認められることを確認した。本結果をもとに、網羅的メタボローム比較解析データを全て再検討し、解糖系・糖新生等の主要糖代謝経路の主要中間代謝産物には大きな変動がないことを確認した。また、好熱菌データベースのマイクロアレイデータを解析、TthNEET

遺伝子発現が培地中の鉄濃度等の生育条件には大きく依存しないことを示唆した。

*T. thermophilus* HB8 ゲノムに His-tag 付き TthNEET 遺伝子と相同組換えした変異株を作成し、表現型解析やプルダウン等を試みた。この株は欠損株ほどではないが、多少グルコース感受性生育阻害を示し、 $\beta$ -cap ドメインに His-tag 付加することで生理機能変化することが示唆された。また、*T. thermophilus* HB27 発現系を利用し、TthNEET 遺伝子過剰発現株を作成したが、プルダウンアッセイ等からは断定的な結論が得られなかった。

(2) シアノバクテリア PirB につき、発現系の改変、変異体作成、結晶化を試みた。C 末側疎水性アミノ酸伸長領域を欠損させると大腸菌で可溶性蛋白質 (PirB\_Ct $\Delta$ 6) として高発現することから、PirB では C 末側疎水性残基領域が膜結合に必要なことがわかった。一方、この C 末領域欠失した可溶性 PirB 蛋白質は酸素感受性が非常に高く、好気条件下では極度に不安定化した。



新たな可溶性 PirB 発現大腸菌株と部分精製酵素で CW EPR 解析を行い、[2Fe-2S] クラスター結合蛋白質であることを確定した。PirB アミノ酸配列には 2 つのクラスター結合モチーフがタンデムにあるにも関わらず、mitoNEET ファミリー特有の 2 つのクラスター間のスピン相互作用に基づく EPR シグナルの特徴的な分裂が観測できなかった。そこで PirB アミノ酸配列よりホモロジーモデルを作成し、この推定構造をもとに近接する 2 つの還元型クラスター間のスピン相互作用シミュレーションしたところ、mitoNEET ファミリー特有な EPR シグナル分裂が期待された。大腸菌発現した可溶性 PirB では、片方のクラスターが十分挿入されないか乖離しやすく不安定化している可能性があり、今後再構成等による検討を要する。すなわち、PirB 系

は酸素感受性が高く、精製、結晶化操作を全て嫌気条件下で行うことが必須とわかった。シアノバクテリア pirB 遺伝子欠損株を作成し、好熱菌の場合と同様に、表現型解析を試みた。ロットにより菌体色調に若干の相違を観測したが、このような pirB 欠損株ロットからメタノール抽出したクロロフィル *a, b* 成分には、とくに異常が認められなかった。シアノバクテリア pirB 欠損株でも液体培養系での生育速度は野生株に比べ遅いことが示唆されたが、そもそも野生株の生育自体が非常に遅く、通気や照射光量など複合要因にも左右されるため、助成期間内では定量解析結果が十分得られなかった。このため、当初 DNA マイクロアレイ解析をすすめる計画だったが、表現型相違の定量有為さ判断が難しく、またマイクロアレイ実験そのものも非常に高価なことも踏まえ、測定の延期を余儀なくされた。今回の結果、シアノバクテリア PirB 鉄硫黄蛋白質の膜結合必須領域を同定できたが、PirB 解析全般については、研究開始当初の期待とは逆に、蛋白質レベルでも生理機能解析レベルでも好熱菌 TthNEET 系より技術的に困難な点が多々あり、モデル生物としての長所を活かす段階まで進捗していない。

(3) 真核細胞ミトコンドリアの mitoNEET はピオグリタゾン等の薬剤結合標的酵素として同定されたが、これまで薬剤結合部位に関する構造生物学の報告例は一切ない。そこで、ラット、シゾン、線虫ミトコンドリア mitoNEET 可溶性ドメインの発現、結晶化を試みた。ラット mitoNEET については、結晶性を改善し高分解能 (1.8 Å) 回折データ収集に成功した。これまで 3 種類の薬剤との共結晶作成に成功し、2 Å 分解能程度での構造精密化をすすめている。これら予備解析結果をもとに、薬剤結合に寄与する可能性の高い各残基候補の変異酵素作成をすすめており、今後これらを用いた薬剤結合アッセイで定量データを補充し、成果公表する道筋ができた。一方、ラット mitoNEET では、結晶格子中の蛋白質分子パッキングの都合でインスリン抵抗性改善薬との共結晶作成には成功しなかった。このため、シゾンおよび線虫由来の mitoNEET 結晶化を継続して試み、線虫 mitoNEET につきラット mitoNEET とは異なる形状の小さな結晶を得た。今後結晶化条件改善と X 線強度データ収集を並行してすすめる予定である。

#### (4) 総括と今後の展望

本研究では遺伝子操作系が高度整備された高度好熱菌とシアノバクテリアの構造生物学・生理学的解析から、当該分野研究でのブレークスルーをはかることを目指した。国内外で連携研究グループを組織し、とくに好熱菌 TthNEET 系において世界で初めて構造機能生理相関に関する重要な新知見を得た。また、

ラット mitoNEET につき幾つかの薬剤結合部位の高分解能構造生物学解析に成功したことも非常に大きな進展であった。MitoNEET ファミリーの生理機能にはまだまだ不明な点が多々ある。すでに本研究主要成果の一部は国際学会等でポスター・口頭発表したが、今後これらの点をもっとも重要な成長点とするとともに、着実に未公表データ細部をつめる解析をすすめて成果公表し、日本発の新しい潮流をつくりたいと考えている。

#### (5) 謝辞

本研究遂行にあたり、多くの皆さんの協力を頂きました。とくに、熊坂 崇 (JASRI/SPRING-8)、長谷川 和也 (JASRI/SPRING-8)、大森 大二郎 (順天堂大)、岩崎 秀雄 (早稲田大)、草野 輝男 (日本医科大)、中野 良治 (日本医科大)、萩生田 絵美 (日本医科大)、深澤 里沙子 (日本医科大)、大島 泰郎 (共和化工(株))、岩崎 容子 (共和化工(株))、Sergei Dikanov (イリノイ大)、Werner Geldenhuys (ノースイースト オハイオ医科大) 諸氏の助言と協力を頂きました。またSPRING-8 ビームラインスタッフの協力を頂きました。その他多くの皆さんからも助力を頂きました。ここにしるして感謝致します。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Iwasaki, T., Fukazawa, R., Miyajima-Nakano, Y., Baldansuren, A., Matsushita, S., Lin, M. T., Gennis, R. B., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Dikanov, S. A. (2012) Dissection of hydrogen bond interaction network around an iron-sulfur cluster by site-specific isotope labeling of hyperthermophilic archaeal Rieske-type ferredoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 19731-19738. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

Hagiuda, E., Miyajima-Nakano, Y., Ohmori, D., Kusano, T., Matsushita, S., Dikanov, S. A., Kumasaka, T., Iwasaki, T. (2012) Characterization of the extremophile homologs of mitoNEET. (#P117) 9th International Congress on Extremophiles. September 2012, Sevilla, Spain.

Fukazawa, R., Lin, M. T., Miyajima-Nakano, Y., Baldansuren, A., Matsushita, S., Choi, S. K., Dikanov, S. A., Gennis, R. B., Iwasaki, T. (2012) Selective isotope labelling of extremophile metalloproteins. (#P119) 9th International Congress on Extremophiles. September 2012, Sevilla,

Spain.

Matsushita, S., Fukazawa, R., Iwasaki, T., Taguchi, A., Baldansuren, A., Dikanov, S. A. (2013) 2D pulsed EPR analysis of histidine ligand residue(s) of the thermophile Rieske and mitoNEET type iron-sulfur proteins. (Mz76) 16th International Conference on Bioinorganic Chemistry. July 22-26, 2013, Grenoble, France.

Iwasaki, T., Miyajima-Nakano, Y., Fukazawa, R., Hagiuda, E., Matsushita, S., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Baldansuren, A., Dikanov, S. A. (2013) Application of 2D pulsed EPR (HYSCORE) in the structural analysis of hydrogen bond network around a biological iron-sulfur cluster. (Mz54) 16th International Conference on Bioinorganic Chemistry. July 22-26, 2013, Grenoble, France.

Fukazawa, R., Lin, M. T., Miyajima-Nakano, Y., Baldansuren, A., Matsushita, S., Dikanov, S. A., Gennis, R. B., Iwasaki, T. (2013) Expression host strains for selective isotope labeling of thermophile enzymes. (#AP.P 15) Thermophiles 2013, 12th International Meeting at the University of Regensburg. September 8-13, 2013, Regensburg, Germany.

Iwasaki, T., Hagiuda, E., Fukazawa, R., Hayashi-Iwasaki, Y., Oshima, T., Dikanov, S. A., Hasegawa, K., Kumasaka, T. (2013) Thermophile homolog of mitoNEET from *Thermus thermophilus* HB8. (#FT.0 02) Thermophiles 2013, 12th International Meeting at the University of Regensburg. September 8-13, 2013, Regensburg, Germany.

岩崎 俊雄：生命進化と鉄硫黄クラスター：蛋白質骨格による機能チューニング。東京理科大学・基礎工学研究科・生物工学専攻 TB 院公開セミナー、2012年10月19日、野田(野田キャンパス講義棟)。

岩崎 俊雄：代謝系進化と補酵素・補欠分子族の関わり。電気通信大学シンポジウム「生命システム原材料の起源と進化：生化学的禁制律」、2013年3月9日、調布(電気通信大学 B 棟)。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.nms.ac.jp/fesworld/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 俊雄 (IWASAKI TOSHIO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：40277497

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

草野 輝男 (KUSANO TERUO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30434129

熊坂 崇 (KUMASAKA TAKASHI)

高輝度光科学研究センター・利用研究促進

部門・副主席研究員

研究者番号：30291066

岩崎 秀雄 (IWASAKI HIDEO)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：00324393